過飽和溶液を利用したリン酸カルシウム成膜と バイオメディカル応用

大矢根 綾 子*

産業技術総合研究所 ナノ材料研究部門 ☎ 305–8565 茨城県つくば市東 1–1–1 中央第 5

(2018 年 12 月 16 日受付；2019 年 1 月 25 日掲載決定)

Calcium Phosphate Coating Using Supersaturated Solutions for Biomedical Applications

Ayako OYANE*

Nanomaterials Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST),
Central 5, 1–1–1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305–8565

(Received December 16, 2018 ; Accepted January 25, 2019)

Calcium phosphate (CaP) coating on artificial materials helps to improve their biocompatibility and osteoconductivity. This review describes our biomimetic CaP coating processes using supersaturated CaP solutions. In the precursor-assisted biomimetic process, a substrate is initially pre-coated with amorphous CaP by alternately dipping in the calcium and phosphate solutions ; this is followed by the immersion of the substrate in a supersaturated CaP solution. This process effectively coats the entire surface of a porous material. In the laser-assisted biomimetic process, a substrate is irradiated using weak pulsed laser light in a supersaturated CaP solution. This process enables quick (<30 min) and area-specific CaP coating. By utilizing the aforementioned processes, various cell-stimulating substances, such as DNA, proteins, and trace elements, can be immobilized within the CaP coatings. Depending on the selection of cell-stimulating substances and processing conditions, the coatings can be designed to perform different biological functions. Our coating processes can be potentially used in several biomedical applications including bone tissue engineering and tooth surface modification.

KEYWORDS : hydroxyapatite, calcium phosphate, laser, supersaturated solution, coating

1. は じ め に

ヒトの骨組織は、有機質であるコラーゲン線維と無機質である水酸アパタイト（以後、単にアパタイト）の微結晶からなるナノ複合体である。骨組織に一般的な人工材料を埋め込むと、生体はそれを異物と認識し、線維性被膜で覆うことで周囲の組織から隔離しようとする。これは、生体に本来備わっている自己防御機構による。しかし、骨組織中に長期間固定して機能を発揮させる人工骨などにこのような機構が働くと、ゆるみなどの原因となって本来の機能を損ねてしまうことがある。これを回避するためには、生体から異物と認識され難い、骨組織

に類似した材料を用いれば良い。そのような材料の代表例が、骨の無機質成分であるアパタイトである。事実、骨の欠損部に埋め込まれたアパタイトセラミックスは、異物であることを見事に隠し、線維性被膜を介さずに骨組織と直接結合する（骨伝導性）¹⁾。 β 型リン酸三カルシウムやリン酸八カルシウム（OCP）などの他のリン酸カルシウム化合物も、骨伝導性を示すことが知られている。これらの骨伝導性リン酸カルシウムは、セラミックス緻密体や多孔体などに加工され、歯や骨を修復するためのインプラントとして古くから臨床応用されてきた。ただし、リン酸カルシウムセラミックスは硬くて脆いため、単体で利用可能な用途は限定的である。そこで、柔軟な高分子材料や強靱な金属材料といった異種材料の表面に薄膜状のリン酸カルシウムを成膜することで、用途

* E-mail : a-oyane@aist.go.jp

拡大が図られてきた。本稿では、筆者らの開発した2種類のリン酸カルシウム成膜技術と、各技術のバイオメディカル応用研究を紹介する。

2. リン酸カルシウム成膜技術

リン酸カルシウム成膜技術としては、プラズマ溶射法、フレイム溶射法などの高温・高エネルギーを利用する手法が一般的である。一方、1990年代後半に、体液に類似したリン酸カルシウム過飽和溶液中で、目的とする基材上にリン酸カルシウム（主にアパタイト）を析出させる成膜技術（過飽和溶液法）が提案された²⁾。この過飽和溶液法は、生体内におけるリン酸カルシウム析出環境を模倣していることから、biomimetic process とも呼ばれる。過飽和溶液法の最大の利点は、体液を模した温和な反応環境と、それに起因する幅広い膜機能制御性にある。以下では、過飽和溶液法を基盤とした筆者らのリン酸カルシウム成膜技術について解説する。

2.1 前駆体利用過飽和溶液法

初期の過飽和溶液法では一般に、基材表面に核形成剤となる官能基（Si-OH, Ti-OH, COOH など）を導入し、同基材をリン酸カルシウム過飽和溶液に一定期間（数日～数週間）浸漬することで、表面にアパタイトを成膜していた²⁻⁵⁾。しかし、複雑な官能基導入処理（光重合法、ゾルゲル法など）に加え、長い成膜時間を必要とすることが課題であった。

筆者らは、過飽和溶液中でのアパタイト形成に先立ち、まずカルシウムイオンが基材表面に取り込まれ、次いでアパタイトの前駆体である非晶質リン酸カルシウム（ACP）が沈着する現象⁶⁾に着目し、この現象を再現する簡便な表面処理技術を確立した⁷⁾。すなわち、Taguchiらの交互浸漬法⁸⁾を単純化し、基材をまずカルシウムイオン溶液に、次いでリン酸イオン溶液に浸漬し、これを数回繰り返すことによって、同基材の表面にACPナノ粒子層を設けた⁹⁾。同処理された基材をリン酸カルシウム過飽和溶液中に浸漬すると、24時間後には数ミクロン厚のアパタイトを成膜することができた（Fig. 1）^{10, 11)}。過飽和溶液への浸漬工程においては、基材表面のACPが溶液中のリン酸カルシウムクラスター^{12, 13)}やイオンを取り込みながら成長しつつ、結晶構造を安定化させていくことにより、低結晶性のアパタイト膜となる。中性の過飽和溶液中では全てのリン酸カルシウム化合物の中でアパタイトが最安定相であるため、以上の反応は自発的に進行する。

本成膜技術によれば、多孔体を含む様々な形態・組成の基材表面に、アパタイトを成膜することができ^{10, 11, 14-17)}。また、酸素プラズマなどによる前処理を施

Fig. 1. (color online). Schematic of the precursor-assisted biomimetic process (left) and scanning electron microscopy (SEM) images (right) of the surfaces of a polycaprolactone (PCL) porous body¹⁰⁾ and a poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) sponge¹¹⁾ coated with apatite using this process.

Table 1. Comparison of the precursor-assisted (left column) and laser-assisted (right column) biomimetic processes.

	Precursor-assisted biomimetic process	Laser-assisted biomimetic process
Number of steps	Multiple	Single
Coating time	~24 h	~30 min
Coating area	Entire surface (large)	Laser-irradiated area (narrow)
Substrate	Little limitation	Laser-absorbing materials
Coatability on a porous substrate	Easy	Difficult

すことで、基材とアパタイト膜との密着強度を制御・向上することもできる¹⁵⁻¹⁷⁾。本成膜技術の特徴を Table 1（左列）にまとめる。

2.2 レーザー利用過飽和溶液法

前項で解説した前駆体利用過飽和溶液法は、初期の過飽和溶液法に比べると簡便・迅速であるものの、表面処理工程と過飽和溶液への浸漬工程を合わせると、通常1日以上を要する。近年筆者らは、過飽和溶液法に液中パルスレーザー照射プロセス^{18, 19)}を併用することによって、より迅速なリン酸カルシウム成膜技術（レーザー利用過飽和溶液法）を開発した^{20, 21)}。この手法では、リン酸カルシウム過飽和溶液中の基材表面に、低エネルギー密度の Nd:YAG パルスレーザー光（紫外光）を照射する（Fig. 2（左））。30分程度照射すると、Fig. 2（右）に示すように、基材表面のレーザー光照射域のみにリン酸カルシウム（アパタイトあるいは OCP）が成膜され

Fig. 2. (color online). Schematic of the laser-assisted biomimetic process (left) and SEM images (right) of the laser-irradiated and non-irradiated surfaces of an ethylene-vinyl alcohol copolymer substrate.²⁰⁾

る。すなわち、従来の過飽和溶液法で必要とされた前処理を行わなくとも、ほんの数十分の1段階工程で成膜が完了する。

レーザー利用過飽和溶液法におけるリン酸カルシウム生成機構に関して、筆者らは現時点で次のように説明している^{20, 21)}。まず、本研究で用いた準安定なリン酸カルシウム過飽和溶液 (25℃) は、溶液中では均一核形成を誘起しない。ただしこの過飽和溶液中には、prenucleation cluster と呼ばれるリン酸カルシウムのナノクラスター^{12, 13)}が存在すると考えられる。過飽和溶液は紫外光をほとんど吸収しないので、照射された紫外レーザー光は基材表面に到達し、基材表面を修飾する。具体的には、表面粗さの増大、親水性官能基の生成、水濡れ性の増大といった表面変化が生じる。こうして表面自由エネルギーの増大した照射面に、過飽和溶液中のリン酸カルシウムナノクラスターやイオンが結合・吸着し、核形成剤として働くことで、リン酸カルシウム結晶の析出を促す。一方で、基材に吸収されたレーザー光エネルギーの一部は熱に変換され、照射面の温度と照射面近傍の液温を局所的に高める。ここで、一般的な無機塩と異なり、アパタイトの溶解度は、室温付近では液温が上がると低下する^{22, 23)}。アパタイトの溶解度積 K_s は文献によりばらつきがあるが、例えば McDowell の報告によると 25℃ の K_s ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ として算出) は $3.04 (\pm 0.25) \times 10^{-59}$ であるのに対し、37℃ では $2.35 (\pm 0.27) \times 10^{-59}$ である²²⁾。アパタイトの前駆体 (OCP, ACP など) についても同様の傾向が報告されている^{23~25)}。よって、液温の上昇する照射面近傍では、物質移動速度だけでなく溶

液の過飽和度がさらに増大し、リン酸カルシウムの核形成・結晶成長を加速する。以上の、レーザーによる表面修飾・加熱効果が、照射域における部位特異的なリン酸カルシウム析出に寄与しているものと考えられる。パルス波照射がリン酸カルシウムナノクラスターやイオンの会合状態・濃度分布に与える影響など、今後検証すべき課題も多い。さらなる検証が進めば本反応機構の詳細が明らかになるだろう。

なお、基材によっては、可視光や近赤外レーザー光によってもリン酸カルシウムを成膜することができ^{26, 27)}。基材の光吸収特性に応じて適切なレーザー光波長を選択し、照射条件 (エネルギー密度、照射時間など) を調整することで、様々な材料基材に本成膜技術を適用することができる^{20, 21, 26~31)}。ただし、成膜がレーザー光照射域 (筆者らの現有システムでは直径 5~8 mm の円) に限定されるため、大面積への成膜や、多孔体内部への成膜には適していない。本レーザー利用過飽和溶液法の特徴を Table 1 (右列) にまとめる。

3. バイオメディカル応用

人工材料の表面にリン酸カルシウムを成膜すると、同材料に生体親和性・骨伝導性を付与することができる。このため、プラズマ溶射法などによりアパタイトを成膜した外科・歯科用の金属製インプラントが上市されている。筆者らは、温和な反応環境をはじめとする過飽和溶液法の特長を生かし、主に有機高分子材料や生体組織を対象としたリン酸カルシウム成膜技術を開発してきた。また、過飽和溶液中にある種の生体分子 (DNA, タンパク質, 抗体など) や生体微量元素 (フッ素など) を添加し、これらの成分をリン酸カルシウム膜中に担持することで、膜機能の向上を図ってきた^{7, 32)}。以下では、前項で解説した各成膜技術の、再生医療応用および歯面改質応用研究を紹介する。

3.1 前駆体利用過飽和溶液法の再生医療応用

再生医療における三大要素は、i) 細胞, ii) 成長・分化誘導因子, および iii) 足場材 (scaffold) である。Scaffold は、細胞の増殖と分化を支持するための基材であり、再生組織の三次元的な形態構築において重要な役割を果たす。Scaffold としては、ポリカプロラクトン (PCL), 乳酸-グリコール酸共重合体 (PLGA), コラーゲンなどの生分解性高分子材料の多孔体が多用されてきた。しかし、これらの高分子材料の骨再生能は一般に、アパタイトに劣る。

筆者らは、前駆体利用過飽和溶液法を用い、多孔性のコラーゲン基材の全表面にアパタイトを成膜した³³⁾。すると、骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1) の孔内部への侵入

が未成膜の基材に比べ促進されることが分かった。また、アパタイトを成膜した高分子材料表面では、未成膜の表面に比べ、同細胞や骨髄由来間葉系幹細胞の接着、増殖、および骨分化が促進されることも分かった^{30, 34)}。以上のように、アパタイトを成膜した高分子材料は、細胞の侵入と接着、増殖、および骨分化に適した表面を有する。また、生体内で、表面のアパタイト膜を介して周囲の骨組織と結合・一体化すると考えられることから、骨組織再生用の scaffold として有用と期待される。

筆者らはさらに、アパタイト膜に DNA を含む複数の生体分子を担持することによって、遺伝子レベルで周囲の細胞や組織に作用する scaffold (gene-stimulating scaffold) の開発にも取り組んできた⁷⁾。具体的には、Shen らの報告³⁵⁾を参考に、DNA (プラスミド) に加えて細胞接着性タンパク質 (ラミニン、フィブロネクチンなど) を過飽和溶液中に添加することで、これらの生体分子とアパタイトを scaffold 表面で複合化した^{36~38)}。この複合化反応は、過飽和溶液中で成長するリン酸カルシウム微結晶の表面に生体分子が吸着していくことで進行する³⁹⁾。このため生体分子は、生成膜の最表面だけでなく、膜内部にも担持される³⁹⁾。こうして DNA とタンパク質を担持したアパタイト膜 (以後、単に複合膜) 上では、Fig. 3 に示すように、細胞の接着と伸展が促進され、この細胞接着界面を介して同細胞内に高効率 (ウイルスを用いない遺伝子導入剤としてはトップクラス) に遺伝子が導入された^{36~38)}。本複合膜は、このような細胞との相互作用を通じ、周囲の細胞の特定の遺伝子発現を誘導し、特定の生体応答を引き出す機能を有する。例えば、骨形成タンパク質-2 (BMP-2) の cDNA を含むプラスミドとフィブロネクチンを担持したアパタイト複合膜は、BMP-2 遺伝子の導入によって骨芽細胞様細胞

(MC3T3-E1) の BMP-2 発現を誘導し、これにより同細胞の骨分化を促進した⁴⁰⁾。さらに、ラット骨欠損モデルを用いた *in vivo* 試験において、この複合膜が、アパタイト膜を凌駕する骨再生能を示すことも実証した⁴⁰⁾。BMP-2 は、骨組織再生を促進するタンパク質製剤として諸外国で臨床応用されているものの、生体内における安定性が極めて低い。本 gene-stimulating scaffold においては、タンパク質の設計図である遺伝子が、scaffold 表面の複合膜から細胞内に導入され、細胞自身に BMP-2 を産生させる。生体内の必要な場所で一定期間 BMP-2 が産生されることから、より長期的な効果が期待される。

過飽和溶液法によれば、生成する複合膜の組成と構造を容易に制御することができる。これによって、複合膜の遺伝子導入機能を精緻にコントロールすることができる。例えば、複合膜の遺伝子導入効率は、膜中の DNA および細胞接着性タンパク質の担持量に応じて制御できる^{36~38)}。複合膜中にフッ素などを担持して膜溶解性を調節すると、遺伝子導入の効率だけでなくタイミングも制御することができる⁴¹⁾。また、細胞接着性タンパク質に替えて抗体を複合膜に担持することで、標的細胞に選択的に遺伝子を導入することもできる⁴²⁾。さらに、同一平面上に遺伝子の種類の異なる領域を設けることで、未分化な細胞 (C3H10T1/2) を、領域毎に別の性質を持つ細胞へと分化誘導することもできる⁴³⁾。すなわち本成膜技術によれば、生体内の目的の場所で、目的の細胞に、意図したタイミングで遺伝子を導入する機能を持つ gene-stimulating scaffold を構築可能と期待される。

3.2 レーザー利用過飽和溶液法の歯面改質応用⁴⁴⁾

歯周病は、歯面での細菌感染により発症し、重症化すると歯の喪失に至る。細菌増殖により歯面と歯周組織との付着 (ペリオドンタルアタッチメント) が破壊されると、上皮組織が侵入して歯周ポケットを形成する。歯周病治療において細菌および感染歯質を取り除いた後の歯面は、本来の歯面に比べ歯周組織との親和性に劣るため、ペリオドンタルアタッチメントを再構築しにくい。このため、残存する歯周ポケットが細菌の温床となり、再発を招きやすい。

歯周治療後の歯面に、抗菌作用を示すフッ素を担持したアパタイトを成膜できれば、ペリオドンタルアタッチメントの再構築を促進し、再発リスクを低減できる可能性がある。このような歯面改質を目的とした成膜技術には、歯科医が治療中に実施可能な迅速性と簡便性に加え、目的とする患部のみに成膜できる部位特異性が求められる。これらの要件を満たす成膜技術としては、2.2 で解説したレーザー利用過飽和溶液法が有用と考えられる。そこで、歯質のモデル物質として焼結水酸アパタイ

Fig. 3. (color online). Schematic of the interface between a cell and a DNA-cell adhesion protein-apatite composite coating on a gene-stimulating scaffold along with the biological functions of the coating.

Fig. 4. (color online). SEM image (upper left), a schematic (upper right), TEM images (lower left, lower middle), and selected area electron diffraction (ED) pattern (lower right) of the F-incorporated apatite coating.⁴⁴⁾

Fig. 5. (color online). Scanning TEM-EDX elemental mapping images of Ca (left), P (middle), and F (right) of the F-incorporated apatite coating.⁴⁴⁾

ト (sHA) 基材を用い、レーザー利用過飽和溶液法によりフッ素担持アパタイトの成膜を試みた。

Fig. 2 (左) と同様の照射システムを用い、フッ化ナトリウム (1 mM) を添加したリン酸カルシウム過飽和溶液中で、sHA 基材の表面に Nd:YAG パルスレーザー光 (30 Hz, 355 nm, 6 W/cm²) を 30 分照射した⁴⁴⁾。SEM、透過電子顕微鏡 (TEM)、およびエネルギー分散型 X 線分光法 (EDX) による分析結果から、照射後の sHA 基材表面にフッ素担持アパタイトが成膜されることを確認した (Figs. 4 and 5)。X 線回折分析の結果を総合すると、得られたフッ素担持アパタイト膜は、Fig. 4 (右上) に示すように、基材表面に対し垂直方向に c 軸配向した針状ナノ結晶の集合体からなることが分かった。これは、結晶の成長過程における幾何学的選別作用による。走査 TEM による EDX 元素マッピング分析において、フッ素はカルシウムおよびリンと同様の分布を示したことから (Fig. 5)、水酸アパタイトからなるマトリックス中に均一に担持されていると考えられた。フッ

素は水酸アパタイト結晶中の水酸基の一部を置換しているものと推定される。なお、フッ素置換は、アパタイトの耐酸性向上に有効であることが知られている。本法で得られたフッ素担持アパタイト膜も、弱酸性のクエン酸緩衝液中で 3 日間にわたって残存し、下地の sHA 基材の酸溶解を抑制した。さらに同膜は、24 時間以上にわたって微量のフッ化物イオンを徐放し (ただし、*in vitro* で細胞毒性を示す濃度に対し 2 桁以上低濃度)、これによって、う蝕原因菌である *Streptococcus mutans* の増殖を抑制した。以上の通り、本レーザー利用過飽和溶液法によって、耐酸性と抗菌性を兼ね備えたフッ素担持アパタイト膜を sHA 基材表面に迅速成膜することができた。

以上は、歯質のモデル物質 (sHA) を用いた予備検討結果である。現在、北海道大学歯学部と共同で、ヒト象牙質基材 (患者の同意を得て、通常の治療目的で採取された歯牙より作製) を用い、本成膜技術の歯面改質応用について検証を進めている。

4. ま と め

本稿前半では、過飽和溶液を反応場とする筆者らのリン酸カルシウム成膜技術について解説した。過飽和溶液法によれば、成膜条件の設定や過飽和溶液への生体分子・元素の添加により、生成膜の組成と構造を容易に制御することができ、これが多彩な膜機能設計を可能にしている。本稿後半では、各成膜技術の応用研究例として、再生医療のための cell-stimulating scaffold の構築、ならびに歯面改質のためのフッ素担持アパタイトの迅速成膜技術について紹介した。これらの技術で得られる複合膜は、単に異物反応を惹起し難いだけでなく、生体内の細胞に生物学的シグナルを与え、特定の応答を引き出す機能を有することから、様々なバイオメディカル応用展開が期待される。

謝 辞

本稿で紹介した筆者らの研究は、NEDO 産業技術助成事業、JSPS 科研費、JST シーズ発掘試験、村田学術振興財団、天田財団、光科学技術研究振興財団、新世代研究所などの助成を受け、産業技術総合研究所の中村真紀博士、伊藤敦夫博士、A.J. Nathanael 博士、M. Mahanti 博士、W. Zhang 博士、横山敬郎博士、北海道大学の宮治裕史博士、西田絵利香博士、宮田さほり博士、部佳奈子氏、眞弓佳代子氏、金本佑生実氏、筑波大学の鶴嶋英夫博士、早稲田大学の村山雅美氏、矢崎侑振博士、山崎淳司教授、その他関係各位と共同で実施された。本紙面を借りて感謝の意を表する。

文 献

- 1) M. Jacho : Clin. Orthop. Relat. Res. **157**, 259 (1981).
- 2) K. Hata, T. Kokubo, T. Nakamura and T. Yamamuro : *J. Am. Ceram. Soc.* **78**, 1049 (1995).
- 3) H.M. Kim, M. Uenoyama, T. Kokubo, M. Minoda, T. Miyamoto and T. Nakamura : *Biomaterials* **22**, 2489 (2001).
- 4) A. Oyane, M. Minoda, T. Miyamoto, R. Takahashi, K. Nakanishi, H.-M. Kim, T. Kokubo and T. Nakamura : *J. Biomed. Mater. Res., Part A* **47**, 367 (1999).
- 5) A. Oyane, M. Kawashita, T. Kokubo, M. Minoda, T. Miyamoto and T. Nakamura : *J. Ceram. Soc. Jpn.* **110**, 248 (2002).
- 6) H. Takadama, H. Kim, T. Kokubo and T. Nakamura : *Chem. Mater.* **13**, 1108 (2001).
- 7) A. Oyane, X.P. Wang, Y. Sogo, A. Ito and H. Tsurushima : *Acta Biomater.* **8**, 2034 (2012).
- 8) T. Taguchi, A. Kishida and M. Akashi : *Chem. Lett.* **27**, 711 (1998).
- 9) A. Oyane, M. Uchida, Y. Ishihara and A. Ito : *Key Eng. Mater.* **284–286**, 227 (2005).
- 10) A. Oyane, M. Uchida, C. Choong, J. Triffitt, J. Jones and A. Ito : *Biomaterials* **26**, 2407 (2005).
- 11) Y. Suzuki, A. Oyane, F. Ikeno, J.K. Lyons and A.C. Yeung : *Catheter. Cardiovasc. Interv.* **74**, 468 (2009).
- 12) K. Onuma and A. Ito : *Chem. Mater.* **10**, 3346 (1998).
- 13) D. Gebauer and H. Cölfen : *Nano Today* **6**, 564 (2011).
- 14) A. Oyane, M. Uchida, Y. Yokoyama, C. Choong, J. Triffitt and A. Ito : *J. Biomed. Mater. Res., Part A* **75A**, 138 (2005).
- 15) Y. Yokoyama, A. Oyane and A. Ito : *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **18**, 1727 (2007).
- 16) Y. Yokoyama, A. Oyane and A. Ito : *J. Biomed. Mater. Res., Part B* **86B**, 341 (2008).
- 17) H. Mutsuzaki, Y. Yokoyama, A. Ito and A. Oyane : *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 19155 (2013).
- 18) E. Pecheva, T. Petrov, C. Lungu, P. Montgomery and L. Pramatarova : *Chem. Eng. J.* **137**, 144 (2008).
- 19) B.H. Lee, A. Oyane, H. Tsurushima, Y. Shimizu, T. Sasaki and N. Koshizaki : *ACS Appl. Mater. Interfaces* **1**, 1520 (2009).
- 20) A. Oyane, I. Sakamaki, Y. Shimizu, K. Kawaguchi and N. Koshizaki : *J. Biomed. Mater. Res., Part A* **100A**, 2573 (2012).
- 21) M. Nakamura and A. Oyane : *J. Mater. Chem. B* **4**, 6289 (2016).
- 22) H. McDowell, T.M. Gregory and W.E. Brown : *J. Res. Natl. Bur. Stand., Sect. A* **81A**, 273 (1977).
- 23) M.J.J.M. van Kemenade and P.L. de Bruyn : *J. Colloid Interface Sci.* **118**, 564 (1987).
- 24) M.S. Tung, N. Eidelman, B. Sieck and W.E. Brown : *J. Res. Natl. Bur. Stand.* **93**, 613 (1988).
- 25) M.R. Christoffersen, J. Christoffersen and W. Kibalczyk : *J. Cryst. Growth* **106**, 349 (1990).
- 26) M. Mahanti, M. Nakamura, A. Pyatenko, I. Sakamaki, K. Koga and A. Oyane : *J. Phys. D: Appl. Phys.* **49**, 304003 (2016).
- 27) A.J. Nathanael, A. Oyane, M. Nakamura, K. Koga, E. Nishida, S. Tanaka and H. Miyaji : *Heliyon* **4**, e00734 (2018).
- 28) A. Oyane, I. Sakamaki, A. Pyatenko, M. Nakamura, Y. Ishikawa, Y. Shimizu, K. Kawaguchi and N. Koshizaki : *RSC Adv.* **4**, 53645 (2014).
- 29) A. Oyane, N. Matsuoka, K. Koga, Y. Shimizu, M. Nakamura, K. Kawaguchi, N. Koshizaki, Y. Sogo, A. Ito and H. Unuma : *Colloid Interface Sci. Commun.* **4**, 5 (2015).
- 30) A. Oyane, M. Nakamura, I. Sakamaki, Y. Shimizu, S. Miyata and H. Miyaji : *PLoS One* **13**, e0206524 (2018).
- 31) A. Oyane, I. Sakamaki, Y. Shimizu, K. Kawaguchi, Y. Sogo, A. Ito and N. Koshizaki : *Key Eng. Mater.* **529–530**, 217 (2013).
- 32) X.P. Wang, A. Ito, X. Li, Y. Sogo and A. Oyane : *Biofabrication* **3**, 022001 (2011).
- 33) J.A. Nathanael, A. Oyane, M. Nakamura, I. Sakamaki, E. Nishida, Y. Kanemoto and H. Miyaji : *ACS Appl. Mater. Interfaces* **9**, 22185 (2017).
- 34) C. Choong, S. Yuan, E.S. Thian, A. Oyane and J. Triffitt : *J. Biomed. Mater. Res., Part A* **100A**, 353 (2012).
- 35) H. Shen, J. Tan and W.M. Saltzman : *Nat. Mater.* **3**, 569 (2004).
- 36) A. Oyane, H. Tsurushima and A. Ito : *Gene Ther.* **14**, 1750 (2007).
- 37) A. Oyane, H. Tsurushima and A. Ito : *J. Gene Med.* **12**, 194 (2010).
- 38) A. Oyane, M. Murayama, A. Yamazaki, Y. Sogo, A. Ito and H. Tsurushima : *J. Biomed. Mater. Res., Part A* **92A**, 1038 (2010).
- 39) A. Oyane, M. Uchida, K. Onuma and A. Ito : *Biomaterials* **27**, 167 (2006).
- 40) W. Zhang, H. Tsurushima, A. Oyane, Y. Yazaki, Y. Sogo, A. Ito and A. Matsumura : *J. Biomed. Sci.* **18**, 62 (2011).
- 41) Y. Yazaki, A. Oyane, Y. Sogo, A. Ito, A. Yamazaki and H. Tsurushima : *Biomaterials* **32**, 4896 (2011).
- 42) Y. Yazaki, A. Oyane, H. Araki, Y. Sogo, A. Ito, A. Yamazaki and H. Tsurushima : *Sci. Technol. Adv. Mater.* **13**, 064204 (2012).
- 43) Y. Yazaki, A. Oyane, Y. Sogo, A. Ito, A. Yamazaki and H. Tsurushima : *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 8294 (2015).
- 44) A.J. Nathanael, A. Oyane, M. Nakamura, M. Mahanti, K. Koga, K. Shitomi and H. Miyaji : *Acta Biomater.* **79**, 148 (2018).